

MiR-27 靶基因的分析及鉴定

夏红飞^① 贺天柱^② 宋培培^① 崔熠^① 马旭^{①*}

(① 国家人口计生委科学技术研究所遗传中心 北京 100081;

② 中国农业大学生物学院农业生物技术国家重点实验室 北京 100093)

摘要: MicroRNAs (miRNAs) 是一类约 20~25 nt 的小分子核苷酸,在细胞内的多种生物学过程,如细胞增殖、凋亡、生长、分化和代谢等过程中具有重要的功能。已知 miR-27 在脂肪细胞和肌肉细胞的发育过程中起了重要作用,其在神经细胞中的表达调节至今仍不清楚。在本研究中,通过 miRBase 和 TargetScan 数据库分析了 miR-27 的靶基因,构建了 miR-27 的真核表达载体,改造了萤火虫荧光素酶和海肾荧光素酶报告载体,将 miR-27 的靶基因 *Bmi1* 的 3'-UTR 融合到报告载体中,转染神经胶质瘤细胞,利用双荧光素酶检测系统分析荧光素酶的活性。研究发现 miR-27a 和 miR-27b 共同的靶基因主要调节发育过程。MiR-27 真核表达载体能产生成熟态的 miR-27。MiR-27a、miR-27b 或 miR-27a 和 miR-27b 联合与 *Bmi1* 的 3'-UTR 的正义序列共转染 U343 细胞能明显降低萤火虫荧光素酶的活性(分别 $P < 0.05$, $P < 0.05$, $P < 0.01$),这提示了 *Bmi1* 可能为 miR-27 的靶基因。

关键词: miR-27;真核表达载体;U343 细胞;*Bmi1* 3'-UTR

中图分类号:Q751 文献标识码:A 文章编号:0250-3263(2010)02-01-10

The Analysis and Identification of MiR-27 Target Gene

XIA Hong-Fei^① HE Tian-Zhu^② SONG Pei-Pei^① CUI Yi^① MA Xu^{①*}

(① *Reproductive and Genetic Center of National Research Institute for Family Planning, Beijing* 100081;

② *State Key Laboratory of Agrobiotechnology, College of Biological Sciences, China Agricultural University, Beijing* 100093, China)

Abstract: MicroRNAs (miRNAs) is singlestranded oligoribonucleotides about 20 – 25 nucleotides (nt) in length and function at many biological process, for example, cell proliferation, apoptosis, growth, differentiation and metabolism. MiR-27 play an important role in adipogenesis and muscle stem cell behavior, but it is unclear about its role in the development of neural cell. In the present study, the target genes of miR-27 was analyzed by miRBase and TargetScan databases. A recombinant miR-27 eukaryotic expression vector was constructed and expressed it in human glioma cells U343. We reconstructed the firefly luciferase and renilla luciferase vector and fused the 3'-UTR of miR-27 target gene *Bmi1* with report gene that was transfected in U343 cells. luciferase activity was detected by Dual-Luciferase Reporter (DLR) Assay. Results showed the common target genes of miR-27a and miR-27b regulated mainly the process of development. MiR-27 eukaryotic expression vector can produce mature miR-27a and miR-27b. Firefly luciferase activity was significantly reduced by cotransfection of miR-27a ($P < 0.05$), miR-27b ($P < 0.05$), combination of both ($P < 0.01$) and sense 3'-UTR of *Bmi1*. These

基金项目 国家重点基础研究发展计划(973 计划)项目(No. 2007CB511905)和国家自然科学基金项目(No. 30800396);

* 通讯作者, E-mail: genetic@263.net.cn;

第一作者介绍 夏红飞,女,助理研究员;研究方向:生殖发育与遗传;E-mail: hongfeixia@gmail.com。

收稿日期:2009-09-14, 修回日期:2009-11-24

results implied that *Bmi1* may be the one of miR-27 target genes.

Key words: miR-27; Eukaryotic expression vector; U343 cells; *Bmi1* 3'-UTR

MicroRNA (miRNA) 是一类长约 21 ~ 23 nt 的非编码的单链 RNA 分子,广泛存在于动物、植物、真菌等多细胞真核生物和衣藻等单核生物中^[1-3]。MiRNA 的研究起始于时序调控小 RNA (stRNAs)。1993 年, Lee 等在秀丽隐杆线虫 (*Caenorhabditis elegans*) 中发现了第一个 miRNA *lin-4*, 可时序调控胚胎后期的发育^[1]。然而, 这些发现很多年没有被重视。直到 2000 年, Reinhart 等又在秀丽隐杆线虫中发现了另一个具有转录后调节功能的小分子 RNA *let-7*, 参与调节线虫从第一幼虫期到第二幼虫期的转变^[2]。随后, 人们开始使用各种方法从动物和植物基因组中寻找 miRNA。

MiRNA 的一个关键作用是通过碱基不完全互补的方式与其靶 mRNA 的 3'-UTR 的特定区域相互作用来抑制靶基因的表达^[4-5]。寻找 miRNA 的靶基因及调控 miRNA 的基因对揭示 miRNA 具体的作用机制是至关重要的。就目前的研究来看, 虽然在各个物种中发现的 miRNA 数量不少, 但是能给出直接证据证明 miRNA 的靶基因及其功能的 miRNA 很少, 这说明现在寻找 miRNA 基因的研究与其功能的研究是脱节的。寻找各种生物的 miRNA 及其靶基因并揭示它们的功能是后基因组时代需要解决的问题之一。

MiR-27 在 2002 年由 Mourelatos 等人从 HeLa 细胞中克隆到^[6]。尽管发现的比较早, 但关于 miR-27 的功能和靶基因的研究较少, 主要见于 2009 年。研究显示过表达 miR-27 能抑制脂肪细胞的形成, 但不影响肌浆蛋白的分化^[7]。MiR-27 通过在转录后水平抑制 Runx1, 促进原始粒细胞向粒细胞的分化^[8], 也通过调节 Pax3 的表达影响肌肉干细胞的行为^[9]。关于 miR-27 在神经细胞中的作用机制目前仍未见报道。

在本研究中, 通过 miRBase 和 TargetScan 数据库分析了 miR-27 的靶基因; 构建了 miR-

27 的真核表达载体, 转染神经胶质瘤细胞 U343 检测成熟态 miR-27a 和 miR-27b 的表达; 将 miR-27 的靶基因 *Bmi1* 的 3'-UTR 融合到改造的荧光素酶载体中, 转染 U343 细胞, 利用双荧光素酶检测系统鉴定 *Bmi1* 为 miR-27 的靶基因。本研究将为深入研究 miR-27 在神经细胞中的作用机制奠定实验基础。

1 材料与方法

1.1 材料 Lipofectamine 2000 脂质体、pCR3.1 载体购自 invitrogen 公司、PCR 试剂盒、T4DNA 连接酶、限制性内切酶 *Bam*H I、*Pst* I、*Xho* I 和 *Hind* III 购自 TaKaRa 公司。质粒抽提试剂盒购自 Qiagen 公司。DMEM/F12 培养基、胎牛血清购自 Hyclone。人神经胶质瘤细胞系 U343 由河北医科大学吴建良博士惠赠。大肠杆菌 JM109、DL2000、50 bp DNA ladder 和 500 bp DNA ladder 购自 TIANGEN 公司。Hybond N + 尼龙膜购自 Pharmacia 公司, [α -³²P]dCTP 购自北京亚辉公司, 预杂交液购自 Roche 公司。pSK-delta-luc 和 pRL221-Rluc 载体由贺天柱提供 (中国农业大学生物学院农业生物技术国家重点实验室)。双荧光素酶分析试剂盒购自 Promega 公司。所有的引物在奥科合成。MiR-27a、miR-27b 和 U6 Northern 杂交探针由 TaKaRa 公司合成。

1.2 方法

1.2.1 MiR-27 靶基因的预测 根据 miRBase Targets 数据库 (<http://cbio.mskcc.org/cgi-bin/mirnaviewer/mirnaviewer.pl>^[10]) 和 TargetScan 数据库 (<http://genes.mit.edu/targetscan.test/ucsc.html>^[11]), 预测 miR-27a 和 miR-27b 的靶基因。分析两个数据库中 miR-27a 或 miR-27b 或 miR-27a 和 miR-27b 共有的靶基因。将这些靶基因利用 GOTM Gene Ontology Tree Machine 对其进行功能分类。

1.2.2 聚合酶链式反应 (PCR) PCR 反应按

试剂盒说明进行 ,所用引物和扩增条件见表 1。 μg/ml 溴化乙锭) 上电泳 ,电泳图谱使用 PCR 产物在 1.5% 琼脂糖凝胶 (含终浓度 0.5 Transilluminator 2020D 凝胶成像仪照相。

表 1 引物序列
Table 1 Primer sequences

基因名称 Gene name	序列号 Accession number	引物序列 Primers sequence	长度 Length (bp)	应用 Application	扩增条件 Amplification condition
Hsa-miR-27a	MI0000085	Forward /BamH I 5'-GCGAAGCTTGGATGGGATTGCTTCCTGT-3' Reverse /Pst I 5'-CTGCTGCAGGTGTTTCAGCTCAGTAGGCA-3'	313	PCR	95℃ 5 min; 94℃ 30 s , 60℃ 30 s , 72℃ 30 s; 30 循环 , 72℃ 7 min
Hsa-miR-27b	MI0000440	Forward /Hind III 5'-CGCAAGCTTCAGGTGCATCTCGTAGCTCT-3' Reverse /BamH I 5'-CATGGATCCGGTCAAGTGCTCTCTCATCC-3'	312	PCR	
Flu		Forward /Hind III 5'-GGCAAGCTTATGGAAGACGCCAAAAACATA-3' Reverse /BamH I 5'-TCTGGATCCTTACAATTTGGACTTTCCGCC-3'	1653	PCR	95℃ 5 min; 94℃ 30 s , 60℃ 30 s , 72℃ 2 min; 30 循环 , 72℃ 7 min
Rlu		Forward /Hind III 5'-GGCAAGCTTATGACTTCGAAAGTTTATGAT-3' Reverse /BamH I 5'-GCTGGATCCTTATTGTTCATTTTGAGAAC-3'	936	PCR	
Bmi1 3'-UTR (sense)	BC011652. 2	Forward /BamH I 5'-CGCGGATCCTACCTGAGACTGTTAAGGAA-3' Reverse /Xho I 5'-GCGCTCGAGGAAACAACACTTACAATGGG-3'	1644	PCR	95℃ 5min; 94℃ 30 s , 60℃ 30 s , 72℃ 2 min; 30 循环 , 72℃ 7min
Bmi1 3'-UTR (antisense)	BC011652. 2	Forward /Xho I 5'-GCGCTCGAGTACCTGAGACTGTTAAGGAA-3' Reverse /BamH I 5'-CGCGGATCCGAAACAACACTTACAATGGG-3'	1644	PCR	
P-miR-27a	MIMAT0000084	GCGGAACCTAGCCACTGTGAA	21	Northern	40℃
P-miR-27b	MIMAT0000419	GCAGAACTTAGCCACTGTGAA	21	Northern	40℃
P-U6	M14486. 1	CGTTCCAATTTAGTATATGTGCTGCCGAAGCGA	106	Northern	42℃

1.2.3 真核表达质粒的构建 (1) 将利用 PCR 方法从人 (Homo sapiens) 基因组扩增的 miR-27a 前体和 pCR3.1 载体用 BamH I 和 Pst I 酶切 ,miR-27b 前体和 pCR3.1 载体用 BamH I 和 Hind III 酶切 ,经凝胶电泳分离、凝胶回收试剂盒回收目的片段 ,用 T4 连接酶连接 miR-27a 前体或 miR-27b 前体和 pCR3.1 载体 ,得到

pCR3.1-miR-27a (p-27a) 和 pCR3.1-miR-27b (p-27b) 质粒 ,再转化感受态 JM109 细菌 ,氨苄霉素抗性筛选 ,用菌落 PCR 的方法鉴定阳性克隆 ,挑选转化阳性克隆接种培养 ,取菌液用少量法提取质粒 ,用 BamH I 和 Pst I 或 Hind III 进行双酶切 ,电泳分析酶切片段。将 PCR 和酶切片段大小均正确的质粒送测序。(2) 将利用 PCR

方法从 pSK- δ -luc 和 pRL221-Rluc 扩增萤火虫或荧光素酶的编码框用 *Bam*H I 和 *Hind* III 酶切,连入 pCR3.1 载体,得到 pCR3-Flu 和 pCR3-Rlu 质粒。(3)将利用 PCR 方法从人的基因组扩增的 *Bmi*1 3'-UTR 的正义序列、反义序列、pCR3-Flu 用 *Bam*H I 和 *Xho* I 酶切,连入 *Bmi*1 3'-UTR 的正义序列、反义序列和 pCR3-Flu,得到 pCR-Flu-*Bmi*1-3'-UTR sense (F-*Bmi*1S) 和 pCR-Flu-*Bmi*1-3'-UTR antisense (F-*Bmi*1AS) 质粒。

1.2.4 Northern 印迹杂交 根据 Sanger microRNA 数据库的 miR-27a 和 miR-27b 序列设计特异探针(表 1)。将提取的总 RNA 取 40 μ g 进行 15% 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳,真空转移到 Hybond + 尼龙膜上,紫外交联 150 s。尼龙膜在预杂交液中于 40 $^{\circ}$ C (miR-128) 或 42 $^{\circ}$ C (U6) 预杂交 2 h,加入 32 P 标记的 miR-128 或 U6 探针杂交过夜;膜洗涤后,用磷屏 (Amersham Biotech-Molecular Dynamics Sunnyvale, CA, USA) 压膜,曝光。使用台风 (Amersham Biotech-Molecular Dynamics Sunnyvale, CA, USA) 对磷屏上的信号强度进行扫描,用 Bio-Rad Quantity One 分析软件进行分析,并经持家基因 U6 校正。

1.2.5 细胞转染 在转染前一天,接种 1.0×10^5 细胞到 48 孔板,在正常条件下培养至 80%~90% 汇合率时转染,将 1.0 μ g p-27a、p-27b 或 p-27a + p27b 与 1.0 μ g F-*Bmi*1S 或 F-*Bmi*1AS 及 0.5 μ g pCR-Rlu 溶于 50 μ l 不含血清和双抗的 DMEM/F12 中,同时 1 μ l Lipofectamine 2000 脂质体也溶解于 50 μ l DMEM/F12 培养液中,分别混匀 DNA 和脂质体溶液,5 min 后,将 DNA 和脂质体室温混合放置 20 min。在这个过程中,吸弃细胞培养液,用不含血清的 DMEM/F12 洗涤细胞两遍。将 DNA 和脂质体混合物加入到 96 孔板中,37 $^{\circ}$ C、5% CO₂、无血清、无抗生素培养 12 h 后换含血清和抗生素的完全培养液中培养 36 h,进行荧光素酶活性分析。

1.2.6 荧光素酶活性测定 将转染 48 h 后的细胞用 $1 \times$ PBS 清洗两次,加入 65 μ l $1 \times$

Passive lysis buffer,室温下震荡 15 min 裂解细胞;吸取细胞裂解液至 1.5 ml Eppendorf 管,离心,吸取 20 μ l 上清液,加入 LAR II 100 μ l 后,立即放入荧光素酶测定仪中进行读值,此读值为报告基因重组体萤火虫荧光素酶的活性。在以上的混合液中再加入 100 μ l Stop&Glo 试剂后,立即放入荧光素酶测定仪中进行读值,此读值为内参质粒海肾荧光素酶的活性。结果表示为萤火虫荧光素酶活性除以海肾荧光素酶活性 (Firefly Luc/Renilla Luc)。pCR-Rlu 为海肾荧光素酶报告基因对照质粒,与萤火虫荧光素酶的报告基因重组体质粒共转染,可以消除由于转染效率以及细胞数量等引起的实验误差。独立实验重复 3 次。应用统计学方法,分析多次独立实验的数值,数据间的差异比较采用 ANOVA 检验,差异显著和差异极显著分别以 0.05 和 0.01 为标准,数据分析采用 SPSS 13.0 软件完成。

2 结果

2.1 MiR-27 靶基因的分析 利用 MiRanda 和 TargetScan 分析 miR-27 的靶基因。MiRanda 分析显示 miR-27a 的靶基因有 1 021 个,miR-27b 的靶基因有 1 031 个。TargetScan 分析显示 miR-27a 和 miR-27b 的靶基因共有 921 个。MiRanda 和 TargetScan 分析中 miR-27a 共有的靶基因有 233 个,miR-27b 共有的靶基因有 249 个,miR-27a 和 miR-27b 共有的靶基因有 211 个。利用 GOTM Gene Ontology Tree Machine 对靶基因进行功能分类,主要从参与的生物学过程、分子功能和细胞组成 3 个方面分析。结果发现 miR-27a 的靶基因有 12 个显著的功能簇(图 1:灰色)。从生物学过程看,miR-27a 的靶基因主要参与发育过程和通过影响细胞周期调节细胞进程及通过 DNA 依赖的转录调节影响细胞代谢。从分子功能看,miR-27a 的靶基因通过调节 3' 5'-循环核苷酸二酯酶的活性影响作用于酯键的水解酶的活性,通过序列特异性的 DNA 结合调节核酸的结合,通过转录因子活性调节转录和 DNA 结合。从细胞组成看,

miR-27a 的靶基因主要是细胞内的细胞器如线粒体等的组成成分。MiR-27b 的靶基因有 7 个显著的功能簇(图 2:灰色)。从生物学过程看,miR-27b 的靶基因主要参与发育过程和通过影响细胞周期调节细胞进程及通过同源粘附影响细胞粘附功能。从分子功能看,miR-27b 的靶基因通过调节 3' 5'-循环核苷磷酸二酯酶的活性影响作用于酯键的水解酶的活性。MiR-27a 和 miR-27b 共同的靶基因有 5 个显著的功能簇(图 3:灰色)。从生物学过程看,靶基因主要参

与发育过程。从分子功能看,靶基因通过调节 3' 5'-循环核苷磷酸二酯酶的活性影响作用于酯键的水解酶的活性,通过转录因子活性调节转录和 DNA 结合。结合三者可见,miR-27a 和 miR-27b 的靶基因均参与了发育过程,Bmi1 是发育过程组蛋白修饰中的一个关键基因,且是 miR-27a 和 miR-27b 共同的靶基因,所以本文选择 Bmi1 作为 miR-27 假定的靶基因进行研究。

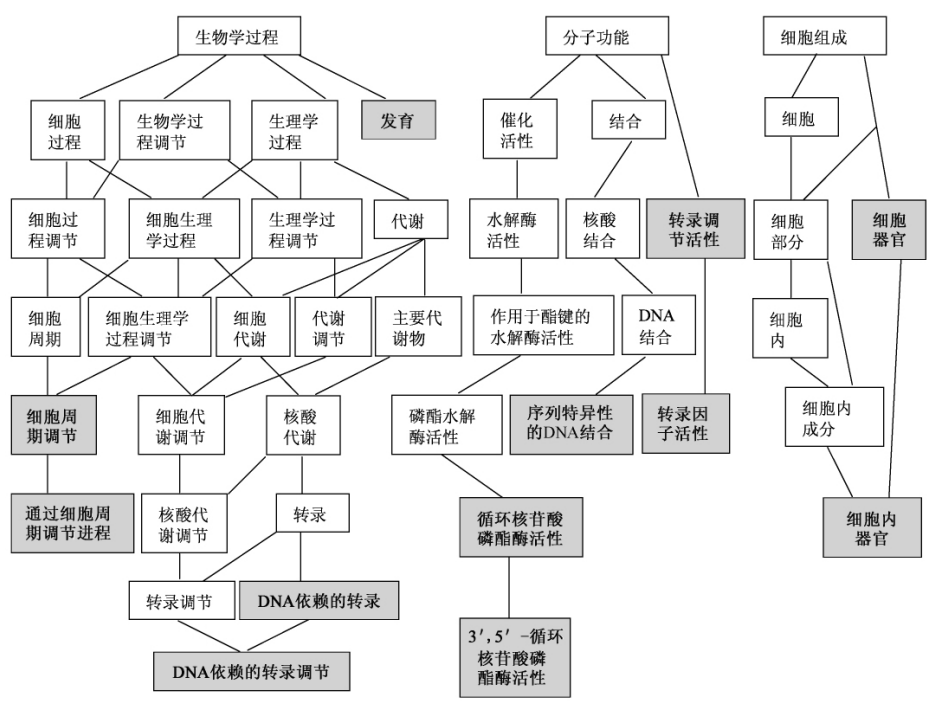


图 1 利用 GOTree Machine (GOTM) 分析 miR-27a 的靶基因

Fig.1 The analysis of miR-27a target genes

灰色部分显示显著的功能簇。Gray represented the significant GO categories.

2.2 表达 miR-27a 和 miR-27b 重组质粒的构建 从人的基因组扩增 has-miR-27a 和 has-miR-27b 前体序列,电泳结果显示均为 300 多个碱基,这与理论扩增的 PCR 片段大小一致(图 4:A)。通过双酶切将 has-miR-27a 和 has-miR-27b 前体序列连入 pCR3.1 载体。用菌落 PCR 的方法鉴定阳性克隆,挑取阳性菌落摇菌,提取质粒,利用限制性内切酶酶切质粒,电泳结果显示均切下 300 bp 多的目标片段(图 4:

B)。为鉴定序列是否正确,将质粒送测序(三博远志,北京,中国),结果与网上发布的序列一致。这些结果证明表达载体构建成功。
2.3 miR-27 真核表达质粒在神经胶质瘤细胞中的表达 将 p-27a 和 p-27b 瞬时转染入神经胶质瘤细胞 U343,对照组转染等剂量 pCR3.1 空载体。48 h 后,用 TRIzol 一步法提取细胞总 RNA,利用 Northern 印迹杂交检测成熟态的 miR-27 的表达,结果显示 p-27a 和 p-27b 质粒

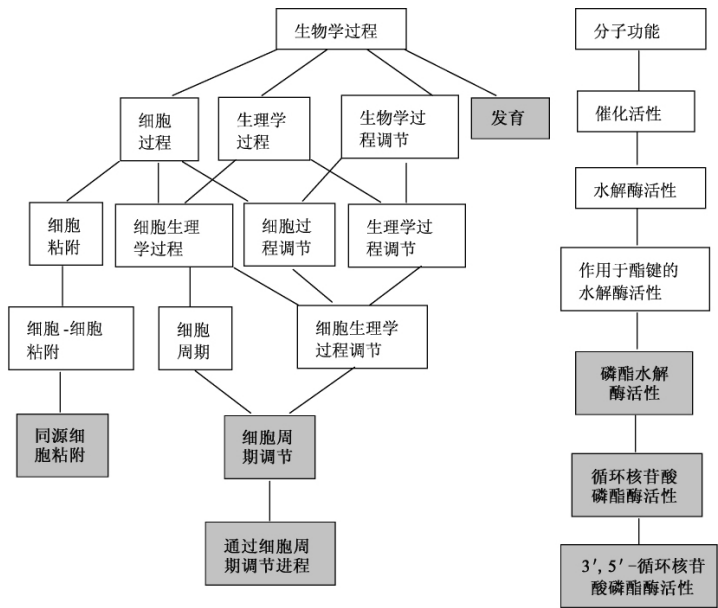


图 2 miR-27b 靶基因功能簇的分析

Fig. 2 The analysis of GO categories of miR-27b target genes

灰色部分显示显著的功能簇。Gray represented the significant GO categories.

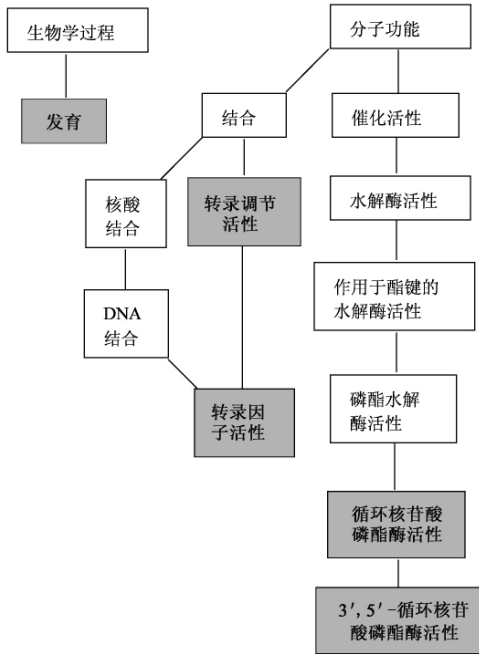


图 3 miR-27a and miR-27b 共同的靶基因功能簇的分析

Fig. 3 The analysis of GO categories of miR-27a and miR-27b target genes

灰色部分显示显著的功能簇。

Gray represented the significant GO categories.

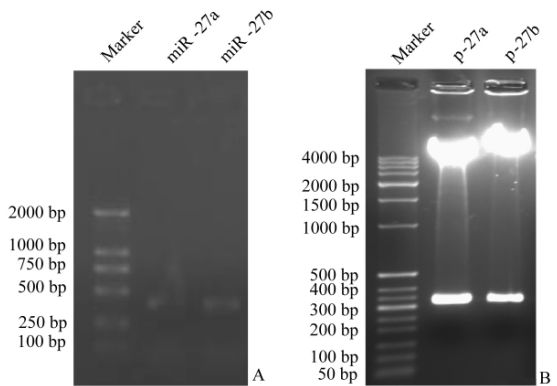


图 4 MiR-27 真核表达载体的构建

Fig. 4 Construction of eukaryotic expression vector miR-27

A. 从人的基因组扩增 miR-27 前体, Marker 是 DL2000 DNA 分子量标准。B. miR-27 真核表达载体 p-27a 和 p-27b 酶切鉴定, DNA 分子量标准是 50 bp DNA ladder 与 500 bp DNA ladder 合用。

A. The precursor fo miR-27 was amplified from human genome, Marker: DL2000 DNA marker.

B. Identification of eukaryotic expression vector miR-27a and miR-27b was identified by enzyme digestion. Marker is the combination of 50 bp DNA ladder and 500 bp DNA ladder.

转染的 U343 细胞成熟态的 miR-27a 和 miR-27b 的表达量均高于对照组 (图 5)。

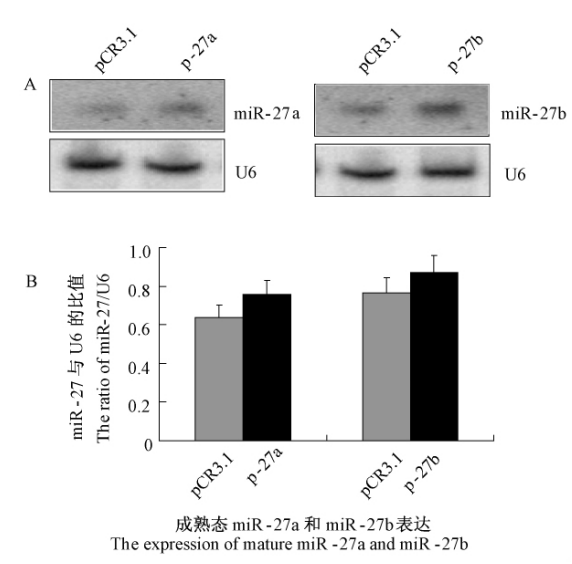


图5 成熟态 miR-27 表达的分析

Fig.5 The analysis of mature miR-27

A. Northern 印记杂交检测成熟态 miR-27 的表达;
B. 密度灰度扫描值统计分析图。
A. The expression of mature miR-27 was detected by Northern blotting; B. Statistical analysis of optical density.

2.4 表达萤火虫荧光素酶 (Flu) 和海肾荧光素酶 (Rlu) 重组质粒的构建 利用 PCR 方法分别从 pSK-delta-luc 及 pRL221-Rluc 扩增萤火虫荧光素酶 (Flu) 和海肾荧光素酶 (Rlu) 编码框序列 (图 6:A), 电泳结果显示均为 1 600 和 900 多个碱基, 这与理论扩增的 PCR 片段大小 (1 653 bp 和 936 bp) 一致 (图 6:B)。通过 BanH I 和 Hind III 双酶切将 Flu 和 Rlu 序列连入 pCR3.1 载体。用 PCR 和酶切的方法鉴定阳性克隆, 电泳结果显示分别切下 1 653 bp 和 936 bp 的目标片段 (图 6:C)。为鉴定序列是否正确, 将质粒送测序, 结果与网上发布的序列一致。这些结果证明表达载体构建成功。

2.5 miR-27 靶基因 Bmi1-报告基因融合质粒的构建 根据 miR-27 靶基因的分析结果显示 Bmi1 是 miR-27a 和 miR-27b 共同的靶基因。从人的基因组 DNA 扩增 Bmi1 的 3'-UTR 序列, 电泳结果显示扩增到 1 600 多个碱基, 这与理论扩增的 PCR 片段大小 (1 644 bp) 一致 (图 7:A)。通过双酶切将 Bmi1 的 3'-UTR 的正义序

列和反义序列连入 pCR3.1 载体, 用 PCR 和酶切的方法鉴定阳性克隆, 电泳结果显示分别切下 1 600 bp 多的目标片段 (图 7:B)。为鉴定序列是否正确, 将质粒送测序, 结果与网上发布的序列一致。Bmi1 的 3'-UTR 的反义序列作为阴性对照。

2.6 荧光素酶活性测定分析 miR-27 的靶基因 U343 细胞转染 p-27a、p-27b 或 p-27a + p-27b 与 F-Bmi1S 或 F-Bmi1AS 及 pCR3-Rlu 质粒培养 48 h 后, 荧光素酶活性测定显示转染 p-27a、p-27b 或 p-27a + p-27b 与 F-Bmi1S 质粒的 U343 细胞, 其荧光素酶活性明显低于转染 p-27a、p-27b 或 p-27a + p-27b 与 F-Bmi1AS 质粒的 U343 细胞, 分别下降 15% ($P < 0.05$)、12% ($P < 0.05$) 和 34% ($P < 0.01$) (图 8)。这些结果显示了 miR-27a 和 miR-27b 能作用于 Bmi1 3' UTR 上的一个结合位点, 抑制其表达水平, 所以, Bmi1 可能是 miR-27a 和 miR-27b 的靶基因。

3 讨论

MicroRNA (miRNA) 是一类进化上保守的、在生命中起着重要调控作用的分子。随着后基因组时代的到来, miRNA 越来越受到人们的关注。近年来发现 miRNA 可能在基因表达调控领域中起着超乎想象的重要作用, miRNA 可能通过基因调控作用对细胞增殖、凋亡和分化等产生影响^[12-13]。然而如何准确预测和鉴定 miRNA 的靶标基因依然是目前 miRNA 研究领域的热点问题。

MiR-27 是一种与组蛋白修饰相关的 miRNA, 组蛋白去乙酰化酶抑制剂 (HDACi) LAQ824 能引起乳腺癌细胞 miR-27a 表达下调^[14]。目前关于 miR-27 靶基因的研究很少, 在 NCBI 的 PubMed 中仅发现以下报道: miR-27 能够调节细胞色素 P450 1B1 的表达^[15]。过表达 miR-27 能抑制 Runx1 的表达, 促进原始粒细胞向粒细胞的分化^[8], 也通过调节 Pax3 的表达影响肌肉干细胞的行为^[19]。

在本研究中, 我们利用 MiRanda 和

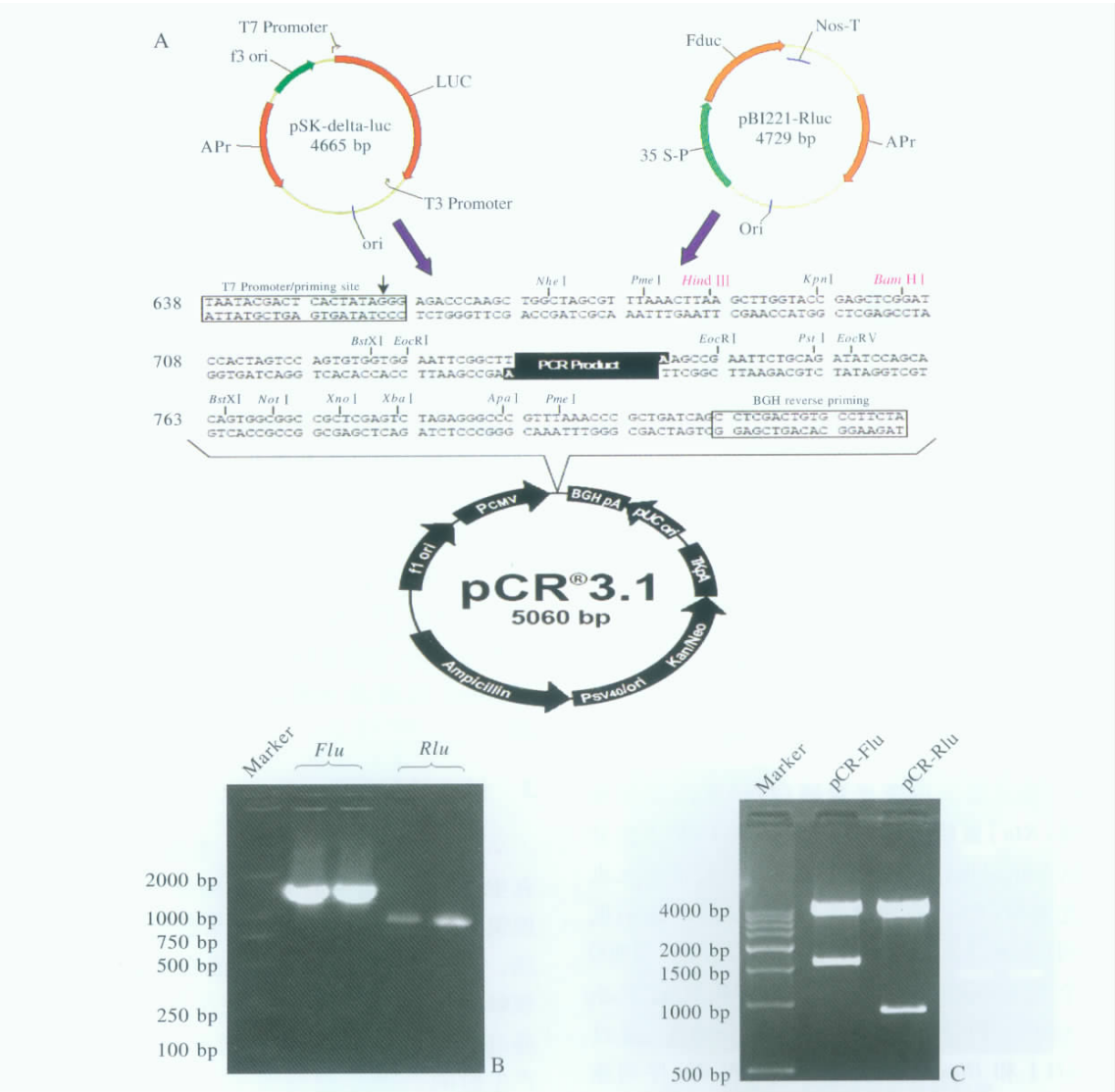


图 6 萤火虫荧光素酶 (*Flu*) 和海肾荧光素酶 (*Rlu*) 载体的构建

Fig. 6 Construction of firefly luciferase and renilla luciferase vector

A. 载体图谱; B. 从 pSK-delta-luc 和 pRL221-Rluc 扩增 *Flu* 及 *Rlu* 编码框序列, Marker 是 DL2000 DNA 分子量标准; C. pCR-*Flu* 和 pCR-Rlu 质粒的酶切鉴定, Marker 是 500 bp DNA 分子量标准。

A. Vector map; B. The sequence of firefly luciferase and renilla luciferase was amplified from pSK-delta-luc and pRL221-Rluc; Marker: DL2000 DNA marker; C. The plasmids of pCR-*Flu* and pCR-Rlu were identified by enzyme digestion; Marker: 500 bp DNA ladder.

TargetScan 分析 miR-27a 及 miR-27b 的靶基因。在两个数据库中 miR-27a 共有的靶基因有 233 个, miR-27b 共有的靶基因有 249 个, miR-27a 和 miR-27b 共有的靶基因有 211 个。利用 GOTM Gene Ontology Tree Machine 对靶基因进行功能分类, 从生物学过程看, miR-27a 和 miR-

27b 共同的靶基因主要参与发育过程。Bmi1 是 miR-27a 和 miR-27b 共同的靶基因, 且 Bmi1 是发育过程组蛋白修饰中的一个关键调节基因^[16], 所以本文选择 Bmi1 作为 miR-27 假定的靶基因进行研究。

当 U343 细胞转染 p-27a、p-27b 或 p-27a +

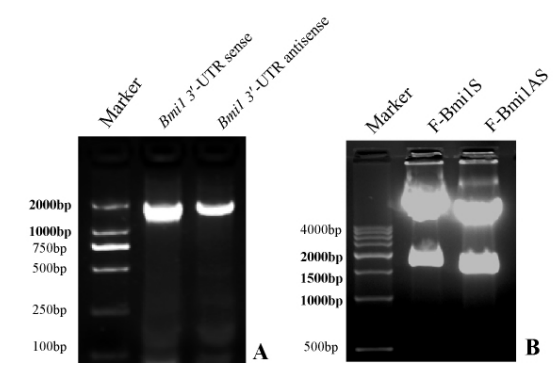


图 7 miR-27 靶基因 *Bmi1*-报告基因融合质粒的构建

Fig. 7 Construction of 3'-UTR of miR-27 target gene *Bmi1* fused with report gene

A. 从人的基因组 DNA 扩增 *Bmi1* 3'-UTR 的正义序列和反义序列,Marker 是 DL2000 DNA 分子量标准;B. F-Bmi1S 和 F-Bmi1AS 质粒的酶切鉴定,Marker 是 500 bp DNA 分子量标准。

A. The sense and antisense sequence of *Bmi1* 3'-UTR was amplified from human genomic DNA; Marker: DL2000 DNA marker; B. The plasmids of F-Bmi1S and F-Bmi1AS were identified by enzyme digestion; Marker:500 bp DNA ladder.

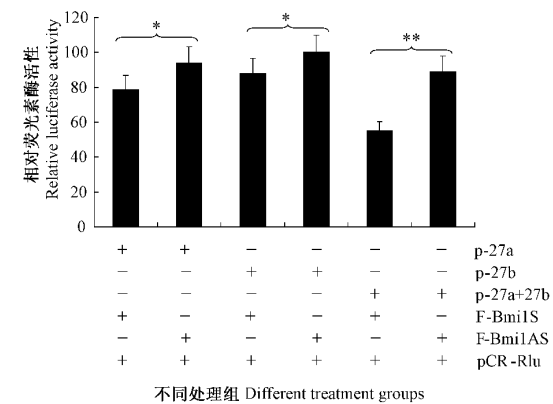


图 8 miR-27 靶基因的鉴定

Fig. 8 The identification of miR-27 target gene

结果表示为萤火虫荧光素酶活性除以海肾荧光素酶活性 (Firefly LUC/Renilla LUC): * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ 。

The results were expressed as relative luciferase activity (Firefly LUC/Renilla LUC): * indicates significant differences ($P < 0.05$), ** indicates significant differences ($P < 0.01$).

p27b 与 F-Bmi1S 或 F-Bmi1AS 及 pCR-Rlu 质粒培养 48 h 后,荧光素酶活性测定显示转染

p-27a、p-27b 或 p-27a + p27b 与 F-Bmi1S 质粒的 U343 细胞,其荧光素酶活性明显低于转染 p-27a、p-27b 或 p-27a + p27b 与 F-Bmi1AS 质粒的 U343 细胞,这些结果显示了 miR-27 过表达能抑制 *Bmi1* 的表达,进而影响 *Bmi1* 作为癌基因所发挥的表观遗传调节,促进细胞增殖和干细胞自我更新等生物学功能^[17-19]。因此,miR-27 的表达通过抑制 *Bmi1*,一方面可以增加神经干细胞整合素依赖的粘附作用^[17],另一方面可以降低体外神经干细胞的增殖和神经发生,这为 miR-27 作为神经胶质瘤干细胞的治疗靶标提供了可能性。

本研究利用生物信息学知识分析了 miR-27 的靶基因,发现其主要参与发育过程。构建的 miR-27 真核表达载体能够在体外培养的 U343 细胞中产生成熟的 miR-27,荧光素酶活性测定分析显示 *Bmi1* 是 miR-27a 和 miR-27b 的靶基因。这些结果提示 miR-27 可能通过调节 polycomb 家族成员 *Bmi1* 影响发育过程,也将为揭示 miR-27 的功能及其参与的调控信号转导通路的网络结构提供有价值的资料。

参 考 文 献

- [1] Lee R C, Feinbaum R L, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. Cell, 1993, 75(5): 843 - 854.
- [2] Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, et al. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. Science 2001 294(5543): 853 - 858.
- [3] Zhao T, Li G, Mi S, et al. A complex system of small RNAs in the unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. Genes Dev 2007 21(10): 1190 - 1203.
- [4] Bagga S, Bracht J, Hunter S, et al. Regulation by *let-7* and *lin-4* miRNAs results in target mRNA degradation. Cell, 2005, 122(4): 553 - 563.
- [5] Petersen C P, Bordeleau M E, Pelletier J, et al. Short RNAs repress translation after initiation in mammalian cells. Mol Cell 2006 21(4): 533 - 542.
- [6] Mourelatos Z, Dostie J, Paushkin S, et al. miRNPs: a novel class of ribonucleoproteins containing numerous microRNAs. Genes Dev 2002, 16(6): 720 - 728.
- [7] Lin Q, Gao Z, Alarcon R M, et al. A role of miR-27 in the

- regulation of adipogenesis. FEBS J 2009 276(8):2348 – 2358.
- [8] Feng J ,Iwama A ,Satake M ,et al. MicroRNA-27 enhances differentiation of myeloblasts into granulocytes by post-transcriptionally downregulating Runx1. Br J Haematol , 2009 ,145(3):412 – 423.
- [9] Crist C G ,Montarras D ,Pallafacchina G ,et al. Muscle stem cell behavior is modified by microRNA-27 regulation of Pax3 expression. PNAS 2009 ,106(32):13383 – 13387.
- [10] Everett P C ,Meyers J A ,Makkinje A ,et al. Preclinical assessment of curcumin as a potential therapy for B-CLL. Am J Hematol 2007 82(1):23 – 30.
- [11] Li L ,Aggarwal B B ,Shishodia S ,et al. Nuclear factor-kappaB and IkappaB kinase are constitutively active in human pancreatic cells , and their down-regulation by curcumin (diferuloylmethane) is associated with the suppression of proliferation and the induction of apoptosis. Cancer 2004 ,101(10):2351 – 2362.
- [12] Lin S Y ,Johnson S M ,Abraham M ,et al. The *C. elegans* hunchback Homolog ,*hbl-1* ,controls temporal patterning and is a probable microRNA target. Dev Cell 2003 4(5):639 – 650.
- [13] Seggerson K ,Tang L ,Moss E G. Two genetic circuits repress the *Caenorhabditis elegans* heterochronic gene *lin-28* after translation initiation. Dev Biol 2002 243(2):215 – 225.
- [14] Scott G K ,Mattie M D ,Berger C E ,et al. Rapid alteration of microRNA levels by histone deacetylase inhibition. Cancer Res 2006 66(3):1277 – 1281.
- [15] Tsuchiya Y ,Nakajima M ,Takagi S ,et al. MicroRNA regulates the expression of human cytochrome P450 1B1. Cancer Res 2006 66(18):9090 – 9098.
- [16] Hashimoto N ,Brock H W ,Nomura M ,et al. RAE28 , BMI1 ,and M33 are members of heterogeneous multimeric mammalian Polycomb group complexes. Biochem Biophys Res Commun 1998 245(2):356 – 365.
- [17] Bruggeman S W ,Hulsman D ,van Lohuizen M. *Bmi1* deficient neural stem cells have increased integrin dependent adhesion to self-secreted matrix. Biochim Biophys Acta 2009 ,1790(5):351 – 360.
- [18] He S ,Iwashita T ,Buchstaller J ,et al. *Bmi-1* over-expression in neural stem/progenitor cells increases proliferation and neurogenesis in culture but has little effect on these functions *in vivo*. Dev Biol 2009 ,328(2):257 – 272.
- [19] Abdouh M ,Facchino S ,Chatoo W ,et al. BMI1 sustains human glioblastoma multiforme stem cell renewal. J Neurosci 2009 29(28):8884 – 8896.

欢迎订阅《动物学杂志》

《动物学杂志》是中国科学院动物研究所、中国动物学会主办的科技期刊,亦是中國自然科学核心期刊。主要报道动物学领域的最新研究成果,介绍有创见的新思想、新学说、新技术、新方法。报道范围既有宏观生态研究,又有微观实验技术。报道层次既有科学前沿性、资料性的,也有技术性、知识性的。稿件内容涉及范围广,实用性强,主要栏目有:研究报告、珍稀濒危动物、技术与方法、研究简报和快讯、科技动态等等。读者对象为动物科学领域的研究、教学、技术、管理人员及广大业余爱好者。

《动物学杂志》双月刊,16开,112页,2010年每册定价35元,全年210元,国内外公开发行。国内邮发代号:2-422;国外发行代号(Code No.):BM58。全国各地邮局均可订阅。如未能在当地邮局订到,可与编辑部直接联系。本刊对在校学生及个人订户7折优惠(直接与编辑部联系订阅)。

地址:北京市朝阳区北辰西路1号院5号 中国科学院动物研究所内 《动物学杂志》编辑部

邮编:100101; 电话:(010)64807162。

E-mail: journal@ioz.ac.cn。 网址:bird.chinajournal.net.cn; dwxzz.ioz.ac.cn。

欢迎投稿、欢迎订阅、欢迎刊登广告。